(AUS DEM KÖNIGL. INSTITUTE FÜR EXPERIMENTELLE THERAPIE
ZU FRANKFURT A. M.)

ÜBER EINEN ATOXISCHEN UND AVIRULENTEN DIPHTHERIESTAMM UND ÜBER DIE AGGLUTINATION DER DIPHTHERIEBACILLEN.

INAUGURAL-DISSERTATION

NEBST BEIGEFÜGTEN THESEN,

DER

HOHEN MEDICINISCHEN FACULTÄT

DER

UNIVERSITÄT BRESLAU

BEHUFS

ERLANGUNG DER MEDICINISCHEN DOCTORWÜRDE

VORGELEGT

VON

ROBERT LUBOWSKI.

ACAD.
MED. BAT.
BIBL.

LEIPZIG,
VEIT & COMP.
1900.

Zum Druck genehmigt auf Antrag des Referenten Herrn Geh. Med.-Rath Prof. Dr. Flügge.

Aus „*Zeitschrift für Hygiene und Infectionskrankheiten*“ 1900. Band XXXV.

Druck von Metzger & Wittig in Leipzig.

Die Frage nach der avirulenten Modification der Diphtheriebacillen kommt von Zeit zu Zeit immer wieder zur Oberfläche.

Darüber, dass der typische, virulente, toxinbildende Diphtheriebacillus eine feststehende Species ist, herrscht kein Zweifel mehr. Da aber die physiologische Breite seiner Lebensäusserungen so gross ist, dass sie bis zum fast völligen Verlust jeder Virulenz und Toxinbildung führen kann, und da ausserdem auch die morphologischen Merkmale des Diphtheriebacillus ebenfalls bis zu einem gewissen Grade schwankend sind, so ist es allerdings theoretisch construirbar, dass ein derartig modificirter Diphtheriebacillus so wenig Charakteristisches hat, dass er nicht mehr von uns als solcher erkannt werden kann. Dazu kommt, dass es eine grosse Anzahl morphologisch ziemlich nahestehender Arten giebt; somit kann es uns nicht Wunder nehmen, wenn manche Autoren bei jedem Befunde von diphtherieähnlichen Bacillen mit der Möglichkeit rechnen, einen echten Diphtheriebacillus in Händen zu haben, der nur als solcher nicht zu erweisen sei, weil er alle übrigen Charakteristika des Diphtheriebacillus verloren habe. Wie bemerkt, ist diese Möglichkeit theoretisch zuzugeben. Praktisch aber hat sie deshalb keine Bedeutung, weil wir jetzt eine solche Reihe genügend constanter morphologischer und physiologischer Eigen-

schaften der Diphtheriebacillen kennen, dass der Verlust sämmtlicher als eine extreme Seltenheit betrachtet werden müsste. Ein Factor allerdings, die Virulenz, schwankt, wie bekannt, in weiten Grenzen und auch die Toxinbildung ist ein durchaus variabler Factor.

Die Zahl der bisher in der Litteratur beschriebenen unvirulenten Diphtheriebacillenculturen ist recht gross, schrumpft aber erheblich zusammen, wenn man nach Beweisen für die wirkliche Diphtherienatur dieser Culturen sucht. Es wurde deshalb folgende Gelegenheit benutzt, einen völlig avirulenten und atoxischen Diphtheriestamm zu studiren: Im städtischen Krankenhause zu Stettin wurden Patienten beobachtet, die ein klinisch gleichartiges Bild boten. Es handelte sich um 5 Fälle von eigenartigen Halserkrankungen bei Erwachsenen, in denen jedes Mal reichlich Diphtheriebacillen gefunden wurden und zwar in 3 Fällen virulent, in den beiden anderen avirulent.[1] Die zwei avirulenten Reinculturen wurden dem Institute zur genaueren Prüfung eingeschickt und wiesen dabei bis auf den Thierversuch — alle Charakteristika des Diphtheriebacillus auf. Die eine dieser beiden — im Folgenden der Kürze wegen „Diphtherie Stettin" genannt — wurde Gegenstand eingehender Untersuchung. Zunächst wurde sie durch Aussaat auf Agarplatten auf Reinheit untersucht. Sie wies dabei dreierlei Sorten von Colonieen auf, eine tiefliegende und zwei oberflächlich liegende Formen. Die tiefliegende Form zeigte nichts Auffallendes, die eine Form der oberflächlichen Colonieen zeigte das fast ganz typische Bild der Diphtheriebacillen-Colonie. Die andere oberflächliche Colonieform aber zeigte derbe, weisse, völlig atypische Colonieen. Es ist das ja bei Diphtherie nichts Ungewöhnliches; hier aber sahen diese Colonien durchaus wie Staphylococcus-albus-Colonieen aus. Die ersten Abimpfungen von diesen verschiedenen Sorten auf Serum und Agar liessen die Differenzen noch deutlich erkennen, und auch in der Morphologie dieser verschiedenen Stämme waren Unterschiede bemerkbar. Aber im Laufe einiger Tage verschwanden diese Unterschiede, und neue Platten, von jedem dieser Stämme gegossen, zeigten wieder alle 3 Colonieformen.

Nunmehr begann die systematische Untersuchung.

Im hängenden Tropfen keine Eigenbewegung der Bacillen. Nach Gram keine Entfärbung (Anilinwassergentianaviolett und Jodjodkali je 2 Min., 96 procent. Alkohol $^1/_2$ Minute).

Das sechsstündige Klatschpräparat von der Löffler-Serumplatte (Fuchsinfärbung) liess typische Anordnung und im Ganzen typische Formen

---

[1] Genaueres über den klinischen Befund u. s. w. vgl. E. Neisser, *Deutsche med. Wochenschrift.* 1900. Nr. 32.

erkennen. Das achtzehnstündige Ausstrichpräparat zeigte gute, typische Doppelfärbung mit essigsaurem Methylenblau und Bismarckbraun.

An Culturmerkmalen sei noch das üppige Wachsthum auf Agar und das gute Wachsthum auf Gelatine hervorgehoben.

In Bouillon entstand staubförmiger Bodensatz an den abhängigen Partieen des Glases, Häutchenbildung war nicht zu erreichen. Die Säureproduction wurde titrimetrisch festgestellt und entsprach den gewöhnlich bei Diphtherie gefundenen Werthen.

Von Bedeutung war noch die Prüfung auf Virulenz und auf Toxinbildung; denn noch immer spielt dieser Punkt in der Unterscheidung von Diphtherieculturen von ähnlichen Arten eine grosse Rolle. Und wenn von autoritativer Seite sogar angegeben ist, dass als einzig sicherer Beweis der Diphtherie-Natur eines fraglichen Stammes nur der Infectionsversuch einerseits, der Heilversuch mit dem specifischen Antitoxin andererseits anzusehen sei, so ist damit ausgesprochen worden, dass ein Stamm, dem jede Virulenz mangelt, nicht als Diphtheriestamm identificirt werden kann. Wie sehr die Toxinbildung der einzelnen Diphtheriebacillenstämme verschieden ist, und wie gelegentlich auch die Toxinbildung des einzelnen Stammes, je nach den Culturbedingungen schwankt, das sind Erfahrungen, welche bei der Herstellung eines wirksamen Giftes oft genug mit Verdruss gemacht werden. Und dass auch die Virulenz, also die Möglichkeit der Ansiedlung im Meerschweinchenorganismus, in beträchtlichem Maasse schwankt, auch darüber herrscht allgemeine Uebereinstimmung. Es ist demnach nach Analogie mit anderen Lebensäusserungen der Bakterien (Farbstoffbildung, Sporenbildung u. s. w.) die Möglichkeit zuzugeben, dass bei einem Stamme diese Gruppen vollständig verloren gegangen sein können, ohne dass es uns mit den gewöhnlichen Culturmitteln gelingt, sie wieder wachzurufen. Man wird eben dann nach anderen Merkmalen für die Identificirung suchen müssen.

Der in Rede stehende Stamm war nun selbst in grössten Dosen für Meerschweinchen unvirulent. Selbst der Bakterienrasen zweier vollbewachsener Löffler-Serumplatten rief nur ein sehr geringes Infiltrat, und später geringen Haarausfall und Nekrose, aber weder Lähmungen noch schwerere Störungen hervor. Und dieses Resultat ergab sich bei allen, vielfach variirten Wiederholungen. Und weder von der Bauchhöhle, noch von der Conjunctiva, noch von der Vulva aus war ein anderes Resultat zu erzielen.

Auch durch Thierpassage oder durch Ueberimpfung von Schilfsack auf Schilfsack, die in die Bauchhöhle von Meerschweinchen eingebracht waren, war eine Virulenzsteigerung nicht zu erreichen.

Die Untersuchung auf Toxinbildung erfolgte in der gewöhnlichen Weise, derart, dass Kolben mit geeigneter Bouillon beimpft, acht Tage bei höherer, acht Tage bei Zimmertemperatur belassen wurden. Dann erfolgte Abtödtung der Bacillen durch Ausschütteln mit Toluol. Die so gewonnene, sterile Culturflüssigkeit erwies sich selbst in grössten Mengen für Meerschweinchen atoxisch. Es war aber denkbar, dass unser Diphtheriestamm, wenn auch nicht Toxin, so doch vielleicht jene verhältnissmässig ungiftige Modifikation des Toxins, die Ehrlich Toxon genannt hat, primär gebildet hätte.

Da aber auch nach Wochen noch keine Lähmungen aufgetreten waren, liegt kein Anhaltspunkt dafür vor, Toxone anzunehmen.

Aus diesem Grunde gelang auch die mehrfach versuchte Immunisirung von Meerschweinchen mit diesem Stamme gegenüber dem Diphtherie-Toxin nicht. Und ebensowenig war nach Einverleibung dieses Stammes das Auftreten von für Diphtheriebacillen bakterieiden Substanzen im Serum der damit behandelten Thiere zu beobachten.

Auch das Serum des später erwähnten immunisirten Ziegenbockes zeigte keine Spur von Antitoxin.

Es wurde deshalb die Identificirung auf dem Wege der Agglutination versucht, wie in dem zweiten Abschnitte beschrieben ist.

Hier seien noch einige Versuche erwähnt, die Hr. Dr. M. Neisser angestellt hat:

Um nämlich von vornherein dem Einwand zu begegnen, dass die auf den Schleimhäuten der Patienten gefundenen Diphtheriebacillen mit dem Krankheitsprocess nichts zu thun hätten, sondern nur zufällige Befunde darstellten, wurde das Serum zweier Patienten auf Antitoxingehalt geprüft, und zwar waren es aus äusseren Gründen die beiden Patienten, welche avirulente Diphtheriebacillenstämme in ihrem Munde beherbergten. Das Serum wurde uns von Stettin aus mit Zusatz von 0·5 Proc. Carbol zur Prüfung zugesandt. Die Prüfung geschah nach der von Ehrlich angegebenen, heute überall acceptirten neueren Methode der Werthbemessung.[1]

Als Testgift wurde das Stationsgift benutzt, dessen Prüfungsdosis ja dauernd überwacht wird, und zur Zeit der Untersuchung 0·51 ccm betrug (= L +); d. h. 1 Immunisirungseinheit (I. E.) entsprach genau 0·51 ccm dieses Testgiftes. In diesen 0·51 ccm Gift waren etwa 35 einfach tödtliche Meerschweinchendosen enthalten. In folgenden beiden Tabellen die Protokolle über die Prüfung der beiden Sera:

---

[1] Ehrlich, Die Werthbemessung des Diphtherieheilserums und deren theoretische Grundlagen. *Klinisches Jahrbuch.* 1897. Bd. VI.

Tabelle I.

Datum: 1. XII. und 4. XII. 1899.

(Das Gesammtquantum der eingespritzten Menge betrug in allen Versuchen 4·5 ccm.)

Gift	Serum	Resultat	Befund
0·025 ccm	—	todt am zweiten Tage	typischer Sectionsbefund.
0·025 „	2·0 ccm	lebt	geringe locale Erscheinungen.
0·025 „	1·0 „	„	
0·025 „	0·5 „	„	

Aus äusseren Gründen konnte eine weitere Einstellung des Serums nicht vorgenommen werden; aber auch hieraus ist schon ersichtlich, dass das Serum schützende Kraft hatte und zwar schützte 1 ccm mindestens gegen 0·05 Gift; 1 ccm enthielt also in minimo 0·1 I. E. Die Serummenge einer Durchschnittspatientin zu 2000 grm berechnet, hatte also diese Patientin dauernd mindestens 200 I. E. in ihrem Körper kreisend.

Viel bedeutender schützte das Serum der zweiten Patientin und zwar jener, welche den genauer untersuchten Diphtheriebacillenstamm geliefert hatte:

Tabelle II.

Gift	Serum	Resultat	Befund
0·025 ccm	—	todt am dritten Tage	typischer Sectionsbefund.
0·025 „	1·0 ccm	lebt	geringe Localerscheinungen.
0·025 „	0·5 „	„	
0·04 „	0·5 „	„	
0·06 „	0·5 „	„	
0·08 „	0·5 „	„	
0·06 „	0·25 „	„	
0·08 „	0·25 „	„	
0·1 „	0·25 „	„	
0·13 „	0·25 „	todt am vierten Tage	

Es geht daraus hervor, dass 1 ccm dieses Serums 0·4 des Giftes glatt neutralisirte. Für 0·52 ccm des Giftes reichte 1 ccm des Serums nicht mehr völlig aus. Wir werden deshalb nach dem ganzen Verlauf der Reihe nicht fehl gehen, wenn wir annehmen, dass dieses Serum etwa als ein einfaches, d. h. als ein solches anzusprechen sei, welches in 1 ccm 1 I. E. enthält.

Es würde demnach die Patientin dauernd eine Antitoxinmenge von etwa **2000** I. E. in ihrem Körper beherbergen.

Es ist dies ein Antitoxingehalt, wie er meines Wissens beim Menschen bisher nicht beschrieben ist. Selbst bei A. Wassermann,[1] dessen Bestimmung übrigens noch nach der älteren Methode erfolgte, entsprach das Serum mit der stärksten Wirksamkeit dem Werthe eines $^1/_5$ Normalserums.

Dass die auf der Schleimhaut dieser Patientin gefundenen atoxischen Diphtheriebacillen gleichwohl diesen hohen Antitoxingehalt hervorgerufen haben, erscheint — zumal angesichts des Thierexperimentes — zunächst gewiss befremdlich, und man muss wohl annehmen, dass diese Diphtheriebacillen ursprünglich ihren vollen Toxicitätsgrad besessen haben, den ja die Stämme der drei anderen Patienten noch zur Zeit der Untersuchung besassen. Dafür spricht, dass der Antitoxingehalt des zweiten Patienten, vier Monate später untersucht, zu welcher Zeit die avirulenten Bacillen in seinem Munde noch immer persistirten, etwas abgenommen hatte:

1 ccm schützte später nicht mehr gegen 0·4 ccm Gift, wohl aber noch gegen 0·2 ccm Gift. Aus äusseren Gründen konnten weitere Untersuchungen in grösserem Umfange nicht ausgeführt werden.

Agglutinationsversuche mit Diphtheriebacillen.

So übereinstimmend die Urtheile der Autoren über den Werth der Agglutinationsmethode bei beweglichen Bakterien sind, so wenig allgemeine Anwendung hat bisher die Agglutination bei unbeweglichen gefunden; natürlich schon deshalb, weil eben das Aufhören der Beweglichkeit eine sichere Unterscheidung und Abgrenzung der Agglutinationswirkung ermöglicht. Gleichwohl hat es nicht an Versuchen gefehlt auch bei unbeweglichen Bakterien sich des Hülfsmittels der Agglutination zu bedienen. Besondere Schwierigkeiten erwachsen natürlich, wenn das betreffende Bacterium in flüssigen Nährmedien bereits in Haufenanordnung wächst. Diese Schwierigkeit ist besonders gross beim Tuberkelbacillus und bei dem Diphtheriebacillus.

Beim Tuberkelbacillus hat sich Courmont[2] dadurch zu helfen gesucht, dass er einen bestimmten Stamm unter besonderen Bedingungen züchtete. Er wollte damit eine wirklich homogene Tuberkelbacillen-Bouilloncultur erreichen. Indessen haben seine Angaben bei neuerlicher Nachprüfung durch Lydia Rabinowitsch im Institut für Infectionskrankheiten

---

[1] A. Wassermann, *Zeitschrift für Hygiene und Infectionskrankheiten.* 1895. Bd. XIX. S. 408.

[2] Courmont et Arloing, *Compt. rend. de l'académie.* 1898.

sowie durch C. Fränkel[1] keine Bestätigung erfahren; und auch in unserem Institute vorgenommene diesbezügliche Untersuchungen haben die Courmont'sche Methode als eine praktisch brauchbare nicht erkennen lassen.

Zu Agglutinationsversuchen mit Diphtheriebacillen ist bisher verwandt worden das Serum von Diphtheriekranken und das Heilserum. Nur Landsteiner[2] und Nicolle[3] haben mit Serum gearbeitet, das nach Injection von abgetödteten Culturen gewonnen war. Durch solches Serum konnte Nicolle seine Diphtheriecultur — er hat nur mit einem Diphtheriestamme gearbeitet — nicht agglutiniren; ebenso wenig durch Heilserum.

Zum gleichen Resultate gelangte Landsteiner. Damit glaubte Nicolle die Angaben Nicolas[4] widerlegt zu haben. Nicolas hatte nämlich Agglutination von Diphtheriebacillen sowohl durch Heilserum wie durch das Serum von mit Heilserum behandelten Patienten erhalten, sie aber bei den Diphtheriekranken vermisst, die nicht mit Heilserum behandelt waren.

Die Differenz in den Resultaten klärte Nicolas[5] durch Untersuchung zwölf verschiedener Diphtheriestämme auf. Von diesen erwiesen sich sechs durch Heilserum agglutinirbar ohne durch normales Serum agglutinirt zu werden, die anderen sechs zeigten keine Spur von Agglutination, weder durch normales noch durch Heilserum. Bruno[6] hat die Versuche Nicolas' aufgenommen und constatirt, dass das Serum der Diphtheriekranken stark agglutinirende Eigenschaften besitze. Alle seine Fälle waren vorher mit Heilserum behandelt. Da ein, tödtlich verlaufener, Fall von Nicolas, der kein Serum erhalten hatte, auch kein Agglutinationsvermögen aufwies, hat Bruno zwei Gesunden Höchster Serum eingespritzt. Vor der Injection war deren Serum wirksam in Verdünnung von 1 : 10. Am dritten Tage nach der Injection war Wirksamkeit bei 1 : 10 bezw. 1 : 30 vorhanden, um dann auf 1 : 60 zu steigen. Die Wirkung der Seruminjection beginnt nach den übereinstimmenden Angaben von Nicolas und Bruno nach 24 Stunden, verschwindet nach 30 Tagen. Meerschweinchen werden durch Seruminjection nicht deutlich beeinflusst. Bruno hat bei

---

[1] C. Fränkel, *Hygienische Rundschau.* 1900. Bd. X. Nr. 13.

[2] Landsteiner, Ueber die Folgen der Einverleibung sterilisirter Bakterien-Culturen. *Wiener klin. Wochenschrift.* 1897. S. 439.

[3] Nicolle, Recherches sur la substance agglutinée. *Annales de l'Institut Pasteur.* Mars 1898.

[4] Nicolas, *Comptes rendus de la société de biologie.* 1896.

[5] Nicolas, *Ebenda.* 1898.

[6] Bruno, Ueber Diphtherie-Agglutination und Serodiagnostik. *Berliner klin Wochenschrift.* 1898. Nr. 51.

Gesunden, die keine Diphtherie durchgemacht und auch kein Serum bekommen hätten, niemals Werthe über 1 : 30 erhalten, bei Diphtheriepatienten (nach Injectionen von Heilserum) bis 1 : 400.

Während aber Nicolas die Steigerung des Agglutinationsvermögens bei Diphtheriekranken ausschliesslich von vorheriger Seruminjection abhängig sein lässt, hat Bruno bei fünf Fällen deutlich positiven Ausfall der Reaction theils vor, theils in den ersten 24 Stunden nach der Injection beobachtet.

Auch Bruno fand unter drei untersuchten Stämmen einen, der weder durch Heilserum noch durch normales Serum agglutinirt wurde, ein den Angaben Nicolas analoges Resultat.

Beide Autoren haben sich der gleichen Methoden bedient; einmal haben sie homogenen[1] Bouilloncultureu das Serum zugesetzt und die Flockenbildung und Klärung der Bouillon im Brütschrank eintreten lassen. (Bruno scheint nur makroskopisch beobachtet zu haben; Nicolas giebt an, dass die makroskopisch sichtbaren Flocken stets Häufchen von deformirten Bacillen entsprochen hätten.) Die Dauer bis zum Beginn der Reaction hat bei Nicolas von einigen Minuten bis zwei Stunden betragen, bis zur Vollendung aber 18—24 Stunden. Nicolas hat auch auf festem Boden gewachsene Diphtheriebacillen in Bouillon aufgeschwemmt, giebt aber an, dass die Reaktion langsamer und minder deutlich aufgetreten sei. Ausserdem haben sie Diphtheriebacillen in Bouillon eingesät, der Heilserum zugesetzt war, und haben dann statt der durch die ganze Bouillon gleichmässig vertheilten Trübung beim Wachsthum, wie sie in den zur Controle mit normalem Serum beschickten Bouillonröhrchen auftrat, klare Flüssigkeit über krümligem Bodensatz — eventuell mit einem Oberflächenhäutchen — erhalten. Ob bei dieser Methode sämmtliche untersuchten Stämme Nicolas sich gleichmässig verhielten ist weder aus Bensaude's[2] Citat, noch aus denen vieler anderer Autoren zu entnehmen.[3] Bruno betont, dass nicht nur die von ihm untersuchten echten Diphtheriebacillen, sondern auch seine Pseudo-Diphtheriebacillen diese Art des Wachsthums zeigten.

Landsteiner gelang es mit seinem Serum nicht, eine Aenderung im Wachsthume zu bewirken.

C. Fraenkel[4] erwähnt gelegentlich, dass ihm eine Unterscheidung der echten Diphtheriebacillen von sieben untersuchten Pseudodiphtheriebacillen-

[1] Ueber deren Herstellung vgl. die Publication Bruno's.

[2] Bensaude, *Le phénomène de l'agglutination des microbes.* Paris 1897.

[3] Nicolas' Arbeiten liegen mir nicht im Original vor.

[4] C. Fraenkel, Zur Unterscheidung der echten und unechten Diphtheriebacillen. *Hygienische Rundschau.* 1896. Nr. 20.

stämmen mittels Agglutination nicht geglückt sei. Ueber die Methode und die Zahl der angewandten Diphtheriestämme macht er keine Angaben.

Bezüglich der Diphtherie sind mithin die in der Litteratur vorliegenden Angaben nach zwei Richtungen hin angestellt worden:

1. um eine leichte und sichere Differenzirung des Diphtheriebacillus von ähnlichen Arten zu ermöglichen,

2. hat man daran gedacht, die Agglutinationsprobe bei der Diphtherie in ähnlicher Weise wie beim Typhus zur Diagnose der Krankheit zu verwerthen.

Dieser letzte Gedanke ist von vornherein nicht besonders glücklich. Gerade bei der Diphtherie hängt alles von einer Frühdiagnose ab. Nach allen vorliegenden Erfahrungen wissen wir aber nunmehr, dass Agglutinine als Reactionsproducte des Körpers einer ziemlich beträchtlichen Zeit zu ihrer Entstehung bedürfen.

Für die Frühdiagnose leistet die bakteriologische Untersuchung völlig ausreichendes, wie uns die tägliche Erfahrung in der Diphtherieuntersuchungsstation unseres Institutes auf's Neue bestätigt.

Für die aus besonderen wissenschaftlichen Gründen eventuell nothwendig werdende Feststellung einer abgelaufenen Diphtherie besitzen wir in der Untersuchung des Serums auf Antitoxin, wie auch unser Fall beweist, ein genügend einfaches und sicheres Mittel.

Dazu kommt noch ein anderer Grund: Nach den bisherigen Erfahrungen müssen wir annehmen, dass die das Agglutinin im Organismus auslösende „Seitenkette" des Bacillus ihm fest anhaftet, jedenfalls aber nicht so leicht wie etwa Toxine in die umgebende Culturflüssigkeit übergeht. So wissen wir, dass Bacillen, die sich dauernd im Darmtractus aufhalten ohne in die Circulation überzugehen, die Entstehung von Agglutininen nicht in nennenswerthem Maasse auslösen. Es ist augenscheinlich zur Entstehung der Agglutinine eine gewisse Ueberschwemmung des Körpers mit den betreffenden Bakterien nothwendig. Bei der Diphtherie dringen ja, wie die Beck'schen Untersuchungen lehren, wohl auch Bacillen in den Organismus ein; es scheint dies jedoch weder die Regel noch in bedeutenderem Grade der Fall zu sein. Es braucht uns deshalb auch aus diesem Grunde nicht Wunder zu nehmen, wenn während einer Diphtherie im Organismus des Menschen Agglutinine im Allgemeinen nicht auftreten.

Und aus demselben Grunde ist es nicht auffallend, wenn im Serum der activ immunisirten Pferde trotz hohen Antitoxingehaltes die Agglu-

tinine fehlen; denn die Immunisirung der Pferde geschieht ja mit dem von Bacillenleibern freien Diphtherietoxin.

Würde man also experimenti causa ein Agglutinin beim Thier hervorrufen wollen, so wäre es unbedingt nöthig, die Bacillenleiber selbst in den Thierkörper einzuführen. Das aber stösst, wie bekannt, bei virulenter Diphtherie auf grosse Schwierigkeiten. Denn selbst abgetödtet — so könnte man sie zur Gewinnung des Agglutinins gebrauchen — rufen Diphtheriebacillenleiber grosse Infiltrate hervor, die einer Steigerung der Immunisirung ein Ziel setzen.

Hr. Geheimrath Ehrlich gab deshalb den Rath, eine Immunisirung mit unserer völlig atoxischen und avirulenten Diphtherie zu versuchen. Der Director der inneren Abtheilung des Städtischen Krankenhauses zu Stettin, Hr. Dr. E. Neisser, hatte die Freundlichkeit, diese Immunisirung an einem Ziegenbocke im Laboratorium seines Krankenhauses vorzunehmen. Sein Serum wurde vor dem Beginn auf antitoxische und agglutinirende Eigenschaften von uns geprüft und wies nichts davon auf. Der Bock erhielt im Laufe von 2 Monaten in steigenden Dosen bei 5tägigen Intervallen in Summa etwa 750 ccm Aufschwemmung lebender Bacillen, die derart hergestellt war, dass auf jede 12- bis 24stündige Serumplattencultur etwa 1 ccm Bouillon verwandt wurde. Die vorletzte injicierte Dosis hatte 125 ccm betragen, die letzte betrug 150. Dann wurde das Thier wegen beginnenden Marasmus getödtet. Das Serum wurde mit 0·5 Procent Carbolzusatz im Eisschrank conservirt.

Für die Beurtheilung der in der Litteratur niedergelegten Beobachtungen über Agglutination von Diphtheriebacillen ist noch im Hinblick auf die oben berührten Schwierigkeiten der Agglutinationsbeobachtung bei unbeweglichen, in Haufen wachsenden Bacillen die Methode der Beobachtung der Agglutination von wesentlicher Bedeutung.

Was zunächst das Ausgangsmaterial betrifft, so kann man von flüssigen Culturen oder von auf festen Nährböden gewachsenen, die aufgeschwemmt werden, ausgehen. Das letztere ist nach den vielfältigen Erfahrungen auf der bakteriologischen Abtheilung unseres Institutes unbedingt das Zweckmässigere. Flüssige Culturen bieten durch die wechselnde Reaction, vielleicht auch noch durch andere die Agglutination beeinflussende Stoffe ein bedeutend weniger gleichmässiges Ausgangsmaterial als auf festen Böden gewachsene, mit physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmte Bakterien, zumal ja bei der Agglutinationsprobe Serum zugesetzt wird, welches gelegentlich bei der Vereinigung mit saueren Bouillonculturen Coagulationserscheinungen zeigt, die leicht Agglutination vortäuschen.

Dass man indessen zuweilen auch mit dieser Methode gute Resultate bekommt, zeigt folgender Versuch:

Tabelle III. (Bouillonculturen.)

Diphtherie-Stamm	Normales Ziegenserum 1 : 40	Normales Ziegenserum 1 : 80	Immunserum 1 : 40	Immunserum 1 : 80	Beobachtungszeit in Stunden
1	—	—	—	—	1
(Diphtherie Stettin)	+	+	wie $^1/_{40}$ normal	deutlicher als $^1/_{80}$ normal	$1^3/_4$
2	+	+?	+	+	1
	+	—?	++	+	$1^3/_4$
3	++	++	++	++	1
	+++	++	+++	+++	$1^3/_4$

In dieser, wie in den späteren Tabellen bedeutet:
+ deutliches Vorhandensein einer wenn auch schwachen Agglutination;
++ starke, auch makroskopisch sichtbare Agglutination;
+++ maximale Agglutination, d. h. nahezu oder ganz klare Flüssigkeit, grosse Häufchen;
— Fehlen jeder Agglutination.
Jede Zeile bedeutet eine Versuchsreihe.

Nächst dem Ausgangsmaterial ist die Methode der Beobachtung von Bedeutung. Angewandt wird im Allgemeinen die makroskopische Beobachtung, die Betrachtung mit schwacher Vergrösserung und mit Immersion. Die letzte ist für Diphtherie unbrauchbar, weil auch die bestvertheilte Aufschwemmung von Diphtheriebacillen stets noch kleine Häufchen in bekannter Anordnung zeigt und damit eine scharfe Grenzbestimmung zwischen normalen und Agglutinationshäufchen unmöglich ist. Dagegen ist die Immersion unbedingt nöthig zur Entscheidung der Frage, ob sichtbare Klümpchen aus Bakterien bestehen oder Niederschläge, Beimengungen u. s. w. darstellen; und zwecks Controle ist sie bei der später berichteten Versuchsreihe in der ersten Zeit dauernd, später nur in einem Theile der Fälle angewandt worden.

Die makroskopische Betrachtung ist aber ebenfalls bei Diphtherie unzweckmässig; denn im Laufe weniger Stunden senkt sich ein Theil der Diphtheriebacillen auch in den specifisch relativ schweren Serum-Kochsalzverdünnungen auf den Boden des Gläschens. Es wurde deshalb nach vielfachen Versuchen eine Methode benutzt, wie sie Dr. M. Neisser schon seit längerer Zeit für die Beobachtung von Agglutinationsvorgängen er-

probt hat, und die sich besonders für Typhus ausgezeichnet bewährt hatte, die Beobachtung im kleinen Petrischälchen.

Zu dem Zwecke kommt in eine Serie Röhrchen je 1 ccm der aufgeschwemmten Bakterienart und ein zweiter Cubikcentimeter, welcher das Serum in entsprechender Verdünnung enthält. So befindet sich dann in jedem Röhrchen die etwa gleiche Anzahl von Bakterien. Die Röhrchen werden nach Umschütteln in die kleinen Doppelschälchen ausgegossen und diese kommen nach sofortiger Musterung in den Thermostaten und werden halbstündlich mit starker Lupe oder schwachem Trockensysteme untersucht. Zu diesem Zwecke empfiehlt es sich, die Schälchen, die gelegentlich die agglutinirten Klümpchen alle auf einer tiefen Stelle, an anderen Stellen klare Flüssigkeit aufweisen, durch abwechselndes Neigen nach den Seiten durchzuspülen. Bei Verwendung dieser Schälchen genügt häufig die Beobachtung der Agglutination mit blossem Auge.

Bei der Diphtherie führte aber diese Methode allein noch nicht zum Ziele, da auch die Controlen zuweilen Haufen zeigten, die, quantitativ zwar von den agglutinirten Proben verschieden, eine genaue Grenzlinie zu ziehen nicht erlaubten.

Es gelang mir, die Schwierigkeit erheblich einzuschränken, indem ich zunächst die Sedimentation verlangsamte und damit theilweise ausschaltete durch Zusatz von Flüssigkeiten von grosser Cohärenz und höherem specifischen Gewichte. Als solche habe ich Nährbouillon, Nährgelatine und Glycerin versucht.

Die später berichtete Versuchsreihe ist mit Glycerinzusatz durchgeführt derart, dass der Bakterienaufschwemmung ein gleiches Volumen 10 procent. Glycerinlösung hinzugefügt wurde, so dass schliesslich jede Agglutinationsprobe ein Glyceringehalt von 2·5 Procent aufwies.

Vor allem aber kam es darauf an, eine ganz feine und gleichmässige Vertheilung der Bakterien in der Flüssigkeit zu erreichen. Sie glückte durch Schütteln der Aufschwemmung mit Glasperlen. Dies bewirkt in einigen Minuten zwar nicht eine völlige Isolirung der einzelnen Keime, aber doch soviel, dass die Aufschwemmung zum Theil aus einzelnen Keimen, zum Theil aus Gruppen von nicht mehr als etwa vier Individuen besteht. Sowohl makroskopisch als mit schwacher Vergrösserung erscheint eine solche Aufschwemmung vollkommen homogen. Eine völlige Isolirung aller Keime ist mit dieser Methode niemals, auch durch mehrstündiges Schütteln sogar mit Schrot nicht zu erreichen, aber, wie der Erfolg zeigt, auch nicht nöthig.

Etwa mit hineingerathene Nährbodenstückchen sinken binnen Kurzem zu Boden. Durch Absitzenlassen und nachfolgendes vorsichtiges Abpipet-

tiren ist ein Hineingerathen dieser Verunreinigungen in die Agglutinationsschälchen mit Sicherheit zu vermeiden. Uebrigens stören solche Bröckchen, da sie mit Agglutinationsflocken wenig Aehnlichkeit haben, nur dann, wenn sie in grösserer Zahl vorhanden sind.

Viel schwieriger und erst bei einiger Uebung möglich ist es, bei der Diphtherie im Gegensatz zum Typhus geringe Grade der Agglutination von ausgesprochener Sedimentation zu unterscheiden, zumal wenn letztere etwa in Folge nicht genügenden Schüttelns etwas körniger ist. Alle in dieses Grenzgebiet fallenden Befunde habe ich in den folgenden Tabellen principiell mit einem Fragezeichen versehen.

Ganz besonders schwierig werden diese Verhältnisse, wenn der Grad der Dichtigkeit der Aufschwemmung nicht richtig bemessen ist. Ich habe in letzter Zeit sehr dichte Aufschwemmungen hergestellt und diese vor der Vermengung mit Glycerin auf den mir passend scheinenden Grad mit Kochsalzlösung verdünnt.

Die Handgriffe bei diesen Agglutinationsversuchen waren mithin folgende. Der mit einem Deckgläschen von der Oberfläche einer Serumplatte[1] abgeschabte Bakterienrasen wird in ein steriles Fläschchen, mit sterilen, vorher mit Säure gewaschenen und wieder entsäuerten Glasperlen[2] übertragen und mit steriler 0.85 procent. Kochsalzlösung bis zur homogenen Emulsion geschüttelt. Absitzen lassen.

(Ein Aufenthalt im Eisschrank von wenigen Tagen hat keinen agglutinationsschädigenden Einfluss.)

Nach gründlicher Vermengung gleicher Quanta Bakterienaufschwemmung und 10 procent. Glycerinlösung kommt 1 ccm davon in je ein Reagensröhrchen. Dann stellt man sich die Verdünnungen des zu verwendenden Serums her und giebt, wie oben erwähnt, immer 1 ccm zu 1 ccm der Bacillenaufschwemmung. Sorgfältig schütteln, Ausgiessen in kleine Petrischälchen, sofortige Prüfung, ob etwa Bröckchen, Flocken oder Niederschläge zu sehen sind. Brütschrank. Untersuchung des Restes der Diphtherieaufschwemmung auf Reinheit.

Die benutzten Diphtherie- und Pseudodiphtherieculturen stammten zum Theil aus den Untersuchungsobjecten unserer Station, zum anderen Theil erhielten wir sie durch die Freundlichkeit der Herren Directoren der hygienischen Institute zu Breslau, Freiburg, Giessen, Halle, Königsberg, München und der inneren Abtheilung des Städtischen Krankenhauses zu Stettin. Auch an dieser Stelle sei es mir erlaubt, meinen ergebensten

[1] Verwendet man, um Verunreinigungen zu vermeiden, auf schrägerstarrtem Serum gewachsene Culturen, so bedarf man 2 bis 3 Röhrchen.

[2] Man nehme nicht zu kleine und nicht zu wenig Glasperlen, etwa gleiche Volumina Perlen und Flüssigkeit.

Tabelle IV.

Diphth.-Stamm	Normales Ziegenserum 1 : 40	Immunserum 1 : 80	Immunserum 1 : 40	Zeit in Stunden	Bemerkungen
1 [1]	—	++	++	$1^1/_2$	
2	—	++	++	$1^1/_2$	Aufschwemmungen hatten mehrere Tage im Eisschrank gestand.
4	—	—(?)	+	$1^1/_2$	
	—	—(?)	++	2	
5	+	+ (stärker als $^1/_{40}$ normal)	+++	2	$^1/_{40}$ normal makroskop. —, $^1/_{80}$ makrosk. +
6	+	++	+++	2	Häufchen ungewöhnl. klein.
7	+(?)	++	+++	3	
8	+	+ (stärker als $^1/_{40}$ normal)	+++	$1^1/_4$	
9	—(?)	++	+++	$1^1/_4$	
10	—	—	—	1	
	—(?)	—(?)	+ (sehrschwach)	2	
	+ (Spuren)	—(?)	+	$2^3/_4$	
11	—(?)	?	+	1	
	++	++	+++	$2^3/_4$	
12	—	—(?)	—(?)	1	
	+	+	++	2	
	+	+	++	$2^3/_4$	
13	+(?)	+	++	$2^3/_4$	
14	+ (stark)	++	+++	$2^3/_4$	
	++	+++	+++	$3^1/_2$	
15	+ (schwach)	+ (stärker als $^1/_{40}$ normal, schwächer als $^1/_{40}$ Immuns.)	+	$2^3/_4$	Nach $3^1/_2$ Stunden Befund ähnlich.
16	—	—	—	2	
	+	+ (stärker als $^1/_{40}$ normal)	++	$3^1/_2$	
17	+(?)	+	++	2	
	+	++	+++	$3^1/_2$	
18	+(?)	+	+	2	
	+ (Spuren)	+ (stark)	stärker als $^1/_{80}$ + (stark)	$3^1/_2$	
19	+(?)	+ (schwach)	+ (stark)	$1^1/_2$	Nach 1 Std. überall Spuren von Agglutin.
	+ (Spuren)	+	++	2	
20	—	+(?)	+	1	

[1] Diphtherie Stettin.

Dank für die bereitwillige Ueberlassung auszusprechen. Die verwendeten Culturen wurden auf Reinheit und auf ihre Diphtherienatur in der hier üblichen Weise untersucht. Vgl. S. 4 ff.

Wie aus vorstehender Tabelle und den der folgenden hervorgeht, war ein agglutinirender Effect des verwendeten Immunserums bei allen 22 untersuchten echten Diphtheriestämmen zu erkennen. Allerdings war die Wirkung bei den verschiedenen Stämmen nicht gleich. Während einige Stämme in sehr ausgesprochenem Maasse auf das Serum reagirten, war bei anderen die Wirkung träger und weniger ausgesprochen, immer aber deutlich.

Die Reactionszeit schwankt zwischen $^1/_2$ und $3^1/_2$ Stunden. Als Mittel mag 1 bis 2 Stunden gelten. Aus dieser Verschiedenheit ergiebt sich ohne Weiteres die Nothwendigkeit einer häufigen — ungefähr halbstündlichen — Besichtigung.

Unter Berücksichtigung der grossen Culturmengen, welche die Ziege erhalten hatte, ist der Agglutinationswerth ihres Serums als ein recht niedriger zu bezeichnen.

So gelang es mir nur bei wenigen Stämmen eine Agglutination mit stärkeren Verdünnungen, etwa 1 : 160 zu erzielen. Andere agglutinirten dann nicht mehr.

Tabelle V.

Diphtherie-Stamm	Normales Serum 1 : 40	Immunserum 1 : 160	Immunserum 1 : 80	Immunserum 1 : 40	Zeit in Stunden
21	—	—	—	—	—
22	? +(?)	+(?) +(?)	+(?) +	— ++	$1^1/_4$ $2^1/_4$
23	—	+	++	++	$1^1/_4$

Es mag hier bemerkt werden, wie auch aus Tabelle IV ersichtlich ist, dass viele Stämme schon durch das Serum von normalen Ziegen in der Verdünnung 1 : 40 Agglutination zeigten. Es wurde deshalb in diesen Fällen nur dann ein positiver Ausfall der Reaction angenommen, wenn handgreifliche Unterschiede zu verzeichnen waren zwischen Immunprobe und Controlprobe. Es erhellt daraus, dass derartige Agglutinationsversuche ohne jedesmalige genau entsprechende Controlversuche keinen Werth haben.

Von Pseudodiphtherieen habe ich nur drei typische Stämme untersuchen können und zwar mit völlig negativem Resultate.

Von anderweitigen Culturen habe ich noch mehrere Kokken- und Heubacillenstämme untersucht; ebenfalls mit negativem Resultate.

Dagegen wurde der andere avirulente Diphtheriestamm, aus Stettin agglutinirt und erwies sich somit als echter Diphtheriebacillus. (Er hatte auch alle Cultur- und färberischen Merkmale eines solchen aufgewiesen; nur die Pathogenität hatte ihm gefehlt; 1·5 ccm einer 2 tägigen Bouilloncultur hatten ein Meerschweinchen von 290 grm nicht getödtet.)

Auf die Frage nach der Agglutinationskraft des Heilserums bin ich nicht näher eingegangen; ich habe mich mit einem Versuche begnügt: Ein 400 faches Serum in den Verdünnungen $^1/_{40}$, $^1/_{80}$, $^1/_{160}$ zeigt gegen die Controlproben mit normalem Pferdeserum $^1/_{40}$, $^1/_{80}$ keine deutlichen Unterschiede.

Ein Versuch mit einem Reste des Stettiner Menschenserums — der allerdings Monate lang im Eisschranke gestanden hatte — ergab einen nicht wesentlich höheren Werth (1 : 40), als ihn Bruno bei Gesunden festgestellt hatte. Der betreffende Diphtheriestamm (Nr. 24) agglutinirte unter dem Einflusse des Ziegenimmunserums; Controle mit normalem Ziegenserum negativ.

Zusammenfassung.

Die vorliegende Untersuchung betrifft einmal das Serum von zwei Patienten mit Diphtheriebacillen; es zeigte sich im einen Falle ein deutlicher, im anderen ein ungewöhnlich hoher Antitoxingehalt.

Die Untersuchung der von diesen Patienten beherbergten Diphtheriestämmen liess ihn als völlig atoxisch und völlig avirulent, im Uebrigen aber als typisch erkennen. In Folge des Fehlens thierpathogener Eigenschaften war eine starke Immunisirung mit lebenden Bacillen möglich. Das so gewonnene Serum agglutinirte 23 verschiedene, sichere, typische Diphtheriestämme und desgleichen die beiden avirulenten Stämme; es agglutinirte nicht die untersuchten Pseudodiphtheriebacillen und andere Bakterien.

Dies bedeutet den Nachweis der Zugehörigkeit jener beiden avirulenten Stämme zur Gruppe der typischen Löffler'schen Bacillen, ein Nachweis, welcher auf dem gewöhnlichen Wege der Virulenzprüfung nicht geglückt war.

Im Gegensatze zu manchen anderen Autoren gelang es mit Hülfe einer besonderen Technik, die sich wohl auch für andere unbewegliche Arten eignen dürfte, das Phänomen der Agglutination bei allen untersuchten Diphtheriestämmen hervorzurufen; aber die Stämme zeigten grosse Verschiedenheiten bezüglich ihrer Reactionsfähigkeit. Aus allen diesen

Gründen kommt der Agglutinationsprüfung für Diphtheriebacillen eine allgemeinere Bedeutung nicht zu; besonders wegen der complicirten Technik und der stark verschiedenen Wirkung auf die einzelnen Stämme.

Es ist mir eine angenehme Pflicht, Hrn. Geheimrath Ehrlich, der mir alle Mittel des Institutes zur Verfügung gestellt hat, meinen ergebensten Dank auszusprechen. Hrn. Dr. Max Neisser, auf dessen Anregung hin und unter dessen Leitung die vorliegende Arbeit ausgeführt wurde, bin ich zu besonderem Danke verpflichtet.

Thesen.

1. Die Agglutination der Diphtheriebacillen ist ein Mittel zur Identifizirung zweifelhafter Bacillenstämme.

2. Die Agglutination der Diphtheriebacillen ist nicht ein Hülfsmittel für die klinische Diagnose der Diphtherie.

3. Es giebt Fälle von Daltonismus, in denen trotz mangelnder Farbenwahrnehmung für Grün die Farbenwahrnehmung für Roth nicht eingeschränkt ist.

Lebenslauf.

Am 18. Januar 1873 als Sohn des Justizraths Carl Lubowski zu Breslau geboren, evangelischer Confession, besuchte ich bis Ostern 1894 das Gymnasium.

Dem Studium der Medicin habe ich ausschliesslich in Breslau obgelegen und mich während dieser Zeit vornehmlich mit Physiologie, Pathologie und Chirurgie beschäftigt. Das Staatsexamen beendigte ich am 1. April 1899.

Ich arbeitete dann bakteriologisch im hygienischen Institut der Universität Freiburg i/B. Am 1. September rückte ich in die daselbst frei werdende Stelle des zweiten Assistenten ein, die ich bis zum 1. April 1900 inne hatte.

Seitdem bin ich auf der bakteriologischen Abtheilung des Königl. Institutes für experimentelle Therapie zu Frankfurt a/M. als Volontär thätig.